鲜三七来源的纳米囊泡制备表征及抗银屑病作用研究

陈翔宇[1], 粟丽君[1], 冉克梅[1], 张 晨[1], 崔艺曦[1], 刘 洋[2], 全 蕾[1], 王 迪[1*], 章津铭[1*]

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学附属医院血管外科, 四川 成都 611130)

摘要: 本研究旨在探讨新鲜三七来源外泌体样纳米囊泡 (*Panax notoginseng*-derived exosome-like nanovesicles, PN-ELNs) 的组成特征及其对银屑病的潜在治疗作用, 为基于植物外泌体改善银屑病的治疗策略提供实验依据。首先采用差速离心法从新鲜三七中分离PN-ELNs, 利用透射电镜和纳米颗粒跟踪分析对其形态及粒径进行表征; 结合脂质组学、蛋白质组学和小RNA测序分析其成分特征及信号通路富集情况; 细胞试验评价其对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 血管形成及人角质形成细胞 (HaCaT) 凋亡的影响; 在咪喹莫特 (imiquimod, IMQ) 诱导的小鼠银屑病样模型中, 观察其对皮损症状、表皮厚度、血管新生及免疫细胞亚群的调节作用。动物实验均按照中国国家科学技术委员会颁布的“实验动物管理条例”和成都中医药大学动物实验伦理委员会批准的议定书 (批准文号2020DL-126) 规范执行。结果显示, 从新鲜三七根茎成功分离出平均粒径为143.9 nm, 且具双层膜结构的PN-ELNs。多组学分析从中鉴定出30种脂质亚类、196种蛋白质及6 056条miRNA, KEGG分析显示其富集的氧化磷酸化及氨基酸代谢通路与银屑病发病机制密切相关。PN-ELNs可显著抑制HUVECs血管形成并促进HaCaT细胞凋亡 ($P < 0.05$), 在小鼠银屑病模型中皮损处涂抹PN-ELNs, 可显著改善皮损 [降低银屑病面积与严重性指数 (PASI) 评分]、减少表皮增厚、抑制血管新生, 并调节$CD4^+/CD8^+$免疫平衡。综上, PN-ELNs可能通过抑制血管新生、促进角质形成细胞凋亡、改善免疫微环境等作用发挥抗银屑病作用。本研究首次系统揭示了PN-ELNs的组成特征及其抗银屑病潜力, 为开发基于植物来源外泌体的新型治疗策略提供了理论支持与实验依据。

关键词: 三七外泌体; 银屑病; 血管新生; HaCaT细胞凋亡; 多组学分析

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0643-12

Preparation, characterization, and anti-psoriatic therapeutic study of *Panax notoginseng*-derived exosome-like nanovesicles

CHEN Xiang-yu[1], SU Li-jun[1], RAN Ke-mei[1], ZHANG Chen[1], CUI Yi-xi[1], LIU Yang[2], QUAN Lei[1], WANG Di[1*], ZHANG Jin-ming[1*]

(*1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China*)

Abstract: This study aims to investigate the compositional characteristics of fresh *Panax notoginseng*-derived exosome-like nanovesicles (PN-ELNs) and their potential therapeutic effects on psoriasis, providing experimental evidence for plant exosome-based therapeutic strategies to ameliorate psoriasis. PN-ELNs were isolated using differential centrifugation and characterized for morphology and size distribution *via* transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. Their compositional profiles and enriched signaling pathways were

收稿日期: 2025-08-18; 修回日期: 2025-10-10.

基金项目: 四川省中医药管理局科研专项课题 (2023MS316); 成都市科技项目 (2024-YF05-02677-SN).

*通讯作者 Tel: 18215620650, E-mail: diwang1992@126.com;

Tel: 13551043885, E-mail: cdutcmzjm@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0969

analyzed through integrated lipidomics, proteomics, and small RNA sequencing. The *in vitro* effects on angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and apoptosis in human keratinocytes (HaCaT) were evaluated. The regulatory effects on lesional symptoms, epidermal hyperplasia, angiogenesis, and immune cell subsets were observed in an imiquimod (IMQ) -induced mouse model of psoriasis. All animal experiments were conducted in accordance with the "Regulations on Laboratory Animals" issued by the National Science and Technology Commission of China and the protocol approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (approval No. 2020DL-126). Results demonstrated the successful isolation of PN-ELNs from fresh *Panax notoginseng* rhizomes, exhibiting a characteristic bilayer membrane structure with an average diameter of 143.9 nm. Multi-omics analyses identified 30 lipid subclasses, 196 proteins, and 6 056 miRNAs, with enriched pathways such as oxidative phosphorylation and amino acid metabolism being closely associated with psoriasis pathogenesis. PN-ELNs significantly inhibited HUVEC angiogenesis and promoted HaCaT cell apoptosis ($P < 0.05$). In the psoriatic mouse model, PN-ELNs significantly ameliorated skin lesions [reduced psoriasis area and severity index (PASI) scores], attenuated epidermal thickening, suppressed angiogenesis, and modulated the $CD4^+/CD8^+$ immune balance. In conclusion, PN-ELNs exert anti-psoriatic effects through multi-target mechanisms (inhibiting angiogenesis, promoting keratinocyte apoptosis, and improving the immune microenvironment). This study provides the first systematic elucidation of the compositional characteristics of PN-ELNs and their anti-psoriasis potential, offering theoretical support and experimental evidence for developing novel therapeutic strategies based on plant-derived exosomes.

Key words: *Panax notoginseng* exosomes; psoriasis; angiogenesis; HaCaT cell apoptosis; multi-omics analysis

银屑病是一种临床多发丘疹鳞屑性皮肤病, 主要病理表现以皮肤红斑、覆有多层银白色鳞屑的丘疹或斑块为特征, 可呈点滴状、斑块状、地图状等, 常伴不同程度瘙痒, 其病程呈慢性、反复发作, 部分患者还可出现关节损害等系统症状[1]。临床治疗多以甲氨蝶呤、环孢素、生物制剂等系统治疗和糖皮质激素、维生素D3类似物、煤焦油制剂等外用涂抹治疗[2]。系统用药可有效控制中重度患者的病情, 但存在免疫抑制、肝肾损伤等全身不良反应, 长期应用受限。外用药物直接作用于皮损部位, 起效快、全身不良反应小, 患者依从性较好, 适用于轻中度银屑病及系统治疗的辅助。然而, 现有外用药多存在疗效有限、长期使用易耐受或复发、局部刺激性强等问题[3,4]。

中医药治疗银屑病备受关注, 中医将银屑病多归为“白疕”“干癣”“松皮癣”等范畴, 其病因病机涉及血热风燥、血瘀阻络、血虚风盛等[5]。“血瘀”是寻常型银屑病迁延难愈的基本病机和关键病理环节, 活血化瘀法是治疗寻常型银屑病的关键所在[5]。近年来, 有较多研究表明活血化瘀法可调节银屑病患者的炎症细胞因子表达水平, 缓解银屑病皮损炎症反应[6-9]。三七被誉为“血证圣药”, 其活血化瘀功效在历代医籍中均有明确记载。《本草纲目》称其“止血不留瘀”, 张锡纯更谓其“化瘀不伤正”。三七的“活血化瘀、生新”特性与银屑病“久病入络、血行不畅”病机高度契合。研究人员应用甘紫三七散治疗银屑病临床患者100例, 取得较好疗效[10]; Yang等[11]运用三七及三七的提取物成功治疗银屑病, 但其有效物质基础和作用机制仍不清楚。

植物源性纳米囊泡 (plant-derived extracellular vesicles, PDEVs) 为来源于植物细胞、直径一般为30～200 nm的类外泌体结构, 具有磷脂双分子层膜包裹, 内含包括蛋白质、多肽、多糖、脂类、miRNA及次生代谢产物等多种活性成分[12], 因其来源广泛、提取相对容易, 安全性高、免疫原性低[13], 及其独特生物学特性而备受关注。近年来研究发现部分植物来源PDEVs具有抗炎、抗氧化、促进创面愈合和皮肤屏障修复等作用, 在皮肤疾病方面展现良好治疗效果[14]。例如: 茶叶[15]源性纳米囊泡能够减少活性氧的产生, 抑制促炎性细胞因子的表达; 苦瓜[16]源性纳米囊泡通过增强血管内皮合成加速烫伤创面愈合; 西柚[17]源性纳米囊泡可协同治疗银屑病和特应性皮炎。因此, 本研究拟首次对新鲜三七来源的纳米囊泡进行提取分离, 并进行形态、结构、物质组成成分的表征, 并对其抑制血管新生和诱导HaCaT细胞凋亡作用进行研究, 并对咪喹莫特 (imiquimod, IMQ) 诱导银屑病样小鼠模型进行外用涂抹治疗, 探究三七外泌体样纳米囊泡外用治疗银屑病的潜力。

材料与方法

仪器 榨汁机 (GYL-Y96, 九阳股份有限公司); 高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 冷冻离心机 (Fresco17, 美国 Thermo Scientific 公司); 纳米粒度仪 (RESUN-G01Nanocoulter, 瑞芯智造科技

有限公司); 流式细胞仪 (NTASinoCyte-85, 中生医疗科技有限公司); 超高分辨成像系统 (TSC SP8 STED, 德国 Leica 公司); 酶标仪 (MK3, 芬兰雷勃集团公司); 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM, JEM-1230, 日本 JEOL 公司)。

药品与试剂 本实验所用三七购自云南省文山壮族苗族自治州, 均为 4 年三七, 经成都中医药大学陈江教授鉴定为来源于五加科植物三七 (*Panax notoginseng*); RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基 (8123594、6125076, 美国 Gibco Life Technologies 公司); PBS 缓冲液、青霉素−链霉素 (G4202、GA2412005, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 胰蛋白酶 (19G04A65, 武汉博士德生物工程有限公司); Zeta 血清、胎牛血清 (24050814、24030701, 浙江天航生物技术有限公司); BCA 蛋白浓度试剂盒 (P0006C, 碧云天生物技术有限公司); PKH67 (D0031, 苏州优逸兰迪科技有限公司); CCK-8 试剂盒、鬼笔环肽、抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) (BS350B、BL1190A、BL701AB, 北京兰杰柯科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (FXP018Pro, 苏州四正柏生物技术有限公司); Matrigel 基质胶 (17824004, 康宁显示科技有限公司); 咪喹莫特乳膏 (明欣利迪 5% 咪喹莫特乳膏 3 g: 0.15 g, 四川明欣药业有限责任公司); 流式抗体 CD3-FITC、CD4-APC、CD8-PE (B42967、B424757、B41167, Biolegend 有限公司)。

细胞株 人永生化角质形成细胞 HaCaT, 购自赛维尔生物科技有限公司细胞库 (STCC00077P); 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

动物 BALB/c 种雄性小鼠, 体重 (20 ± 2 g), 购自达硕 (成都) 生物技术有限公司, 生产许可证: SCXK (川) 2025-0030, 动物实验均按照中国国家科学技术委员会颁布的“实验动物管理条例”和成都中医药大学动物实验伦理委员会批准的议定书 (批准文号 2020DL-126) 规范执行。

PN-ELNs 的提取与表征

PN-ELNs 的提取 将新鲜三七根茎切成小片, 加入适量的 PBS 缓冲液 (三七药材∶PBS 缓冲液质量比 1∶2), 破碎榨汁, 纱布过滤取滤液, 采用差速离心法制备新鲜三七来源外泌体样纳米囊泡 (*Panax notoginseng*-derived exosome-like nanovesicles, PN-ELNs)。依次采用 1 000 ×*g* 离心 10 min 取上清、10 000 ×*g* 离心 1 h 取上清、100 000 ×*g* 离心 2 h, 所得沉淀加入适量 PBS 重悬, 0.80 μm 微孔滤膜滤过, 即得鲜三七来源外泌体样纳米囊泡 (PN-ELNs), −80 ℃贮藏备用。

TEM 观察形态 将镀碳支持膜铜网放到封口膜上, 取适量 PN-ELNs 样品滴加到支持膜铜网上, 10 min 后磷钨酸染色 90 s, 滤纸吸去多余的染液, 晾干铜网, 透射电镜观察囊泡结构并拍照。

粒径分布分析 将 PN-ELNs 样品适当稀释并吹打均匀, 取适量加入纳米颗粒跟踪分析技术 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测槽中, 设置软件程序, 调焦, 保证视野范围内颗粒呈现不规则布朗运动, 以 30～40 个颗粒为最佳, 检测读数并记录。

蛋白浓度测定 将 PN-ELNs 样品依次使用 0.8 μm、0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 过滤后的样品加入 96 孔板中, 按照 BCA 蛋白试剂盒说明书制作标准曲线的蛋白浓度, 每孔加入 300 μL 的显色剂于纳米囊泡/蛋白标准品浓度。利用酶标仪在 595 nm 波长下检测吸光度 (OD) 值并计算蛋白浓度。

PN-ELNs 组成分析

脂质组成分析 取 170 μL PN-ELNs 囊泡样品, 加入 1 mL 脂质提取液 (甲基叔丁基醚∶甲醇 = 3∶1, *v*/*v*), 室温下 2 500 r·min^{-1} 震荡 5 min; 加入 200 μL 超纯水, 震荡 1 min, 4 ℃静置 10 min; 在 4 ℃条件下, 12 000 r·min^{-1} 离心 1 min, 移取上清液 500 μL 至离心管中, 在 20 ℃氮吹至完全干; 加入 200 μL 混合溶剂 (乙腈∶异丙醇 = 1∶1, *v*/*v*) 复溶, 涡旋 3 min, 12 000 r·min^{-1} 离心 3 min, 移取上清液。后续 LC-MS/MS 组学检测、脂质定量与定性由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司完成。

蛋白组成分析 按照 PN-ELNs 囊泡样品/裂解液 (8 mol·L^{-1} 尿素, 1% SDS, 含蛋白酶抑制剂) 体积比 1∶10, 冰浴超声裂解 2 min, 静置 30 min; 12 000 ×*g* 离心 30 min (4 ℃) 后, 取上清。采用 BCA 蛋白试剂盒测定囊泡中蛋白浓度, PN-ELNs 囊泡中蛋白组成采用 LC-MS/MS 蛋白组学检测, 蛋白质定量与生物信息分析由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司完成。

miRNA 组成分析 按 PN-ELNs 囊泡样品/裂解液体积比 1∶10 加入 TRIzol® 裂解液 (含 1% *β*-巯基乙醇), 涡旋振荡 30 s 使样品充分裂解, 室温静置 5 min。加入 0.2 倍体积氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 3 min。4 ℃, 12 000 ×*g* 离心 15 min, 小心吸取上层无色水相 (含 RNA) 至新离心管。加入等体积异丙醇, 轻柔颠倒混匀, −20 ℃静置 30 min。4 ℃, 12 000 ×*g* 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉淀附着于管底。加入 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 涡旋混匀后 4 ℃, 7 500 ×*g* 离心 5 min, 弃上清。PN-ELNs 囊泡中 miRNA 组成与生物信息分析由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司完成。

PN-ELNs 对 HaCaT、HUVECs 细胞增殖的影响

HaCaT、HUVECs 细胞分别采用含有 10% 胎牛 Zeta life

血清和10%胎牛血清的1%双抗的DMEM培养基培养, 取对数生长期的细胞接种于96孔板, 每孔8 000个, 于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中培养。细胞贴壁后, 设置阴性对照组 (只含CCK-8溶液); 对照组、PN-ELNs组 (以囊泡蛋白质量浓度计, 根据囊泡对HaCaT、HUVECs细胞的IC_{50}值, 将囊泡蛋白浓度梯度分别设为0、20、50、100、200、400、600 μg·mL^{-1}和0、10、25、100、200、400 μg·mL^{-1}), 孵育24 h, 加入10% CCK-8溶液, 避光孵育1.5 h后使用酶标仪于450 nm波长处检测OD值, 计算细胞存活率和IC_{50}值。

细胞存活率 (%) = ($OD_{实验组}$ − $OD_{空白组}$)/($OD_{对照组}$ − $OD_{空白组}$) × 100%

PN-ELNs在HUVECs细胞摄取定量和成像观察 将荧光探针PKH67与PN-ELNs于37 ℃避光孵育30 min, 对PN-ELNs进行荧光标记, 超高速离心 (100 000 ×*g*, 1 h) 去除游离染料, 对PKH67-PN-ELNs进行荧光定量。将处于对数生长时期的HUVECs细胞接种于12孔板, 每孔2×10^{5}细胞, 贴壁后弃培养基加入含PKH67-PN-ELNs的新鲜培养基 (以囊泡蛋白质量浓度计, 0、20、50、100 μg·mL^{-1}) 并设置只含PKH67的新鲜培养基共培养2 h, 胰酶消化, 离心收集细胞, 加入少量PBS重悬细胞, 使用流式细胞术分析PN-ELNs在HUVECs细胞摄取的浓度依赖性。

将1×10^{4}个HUVECs细胞接种于共聚焦皿, 贴壁生长后加入含PKH67, PKH67-PN-ELNs (以囊泡所含蛋白质量浓度计, 50 μg·mL^{-1}) 新鲜培养基, 共培养2 h后弃掉培养基。使用福尔马林固定细胞20 min, 再使用鬼笔环肽 (5 μg·mL^{-1}) 和DAPI (1 μg·mL^{-1}) 对细胞骨架与细胞核进行染色, 随后使用超分辨成像系统进行荧光成像并拍摄图片。

PN-ELNs对HUVECs体外成管能力的影响 预先将Matrigel基质胶均匀铺于96孔板中, 待基质胶凝固。将处于对数生长期的HUVECs接种于该96孔板, 密度为每孔1.5×10^{4}个, 加入含有不同囊泡蛋白质量浓度的培养基 (0、20、100 μg·mL^{-1}), 置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养5 h后, 显微镜下观察, Image J分析细胞成管图的总分支数量并进行统计。

PN-ELNs对HaCaT细胞凋亡作用 将处于对数生长期的HaCaT细胞接种于24孔板中, 接种密度为每孔1×10^{5}个, 贴壁后弃掉培养基, 设置对照组和PN-ELNs组 (以囊泡蛋白质量浓度计, 0、100、200、400 μg·mL^{-1}), 分别使用空白培养基和含PN-ELNs的培养基处理4 h, PBS清洗两次。用胰酶消化、离心收集细胞, 适量PBS重悬细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC双染荧光标记试剂避光孵育5 min。再加入10 μL PI染色剂吹打混匀后, 立即流式细胞仪检测。

PN-ELNs外用对银屑病样小鼠模型治疗作用 将24只BALB/c小鼠, 剃除背毛, 适应性饲养3天后, 随机平均分成4组 (每组6只): control组、model组、PN-ELNs-L组、PN-ELNs-H组。除control组外, 其余每组小鼠背部每天连续均匀涂抹80 mg IMQ; 分别在第6、7天, 涂抹IMQ 6 h后, 在背部病灶处涂抹200 μL不同浓度的PN-ELNs, 即PN-ELNs-L组和PN-ELNs-H组分别给药剂量为50和100 mg·kg^{-1} PN-ELNs (按照蛋白浓度计)。实验期间小鼠银屑病模型的临床症状采用银屑病面积与严重性指数 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分标准, 从红斑、鳞屑和浸润增厚3项指标进行评价 (表1), 以0～4分进行记分, 将3个指标的积分相加得到总积分。PASI评分标准如下: 0分, 无症状; 1分, 轻度; 2分, 中度; 3分, 重度; 4分, 极重度。每天于涂抹IMQ乳膏之前由受过训练的实验人员进行单盲评价并拍照记录。

Table 1 Psoriasis area and severity index score (PASI)

Score	Erythema	Scale	Incrassation
0	None	None	None
1	Slight	Slight	Slight
2	Moderate	Moderate	Moderate
3	Marked	Marked	Marked
4	Very marked	Very marked	Very marked

在第8天采用异氟烷将实验小鼠安乐死, 收集小鼠背部给药区域的皮肤组织, 对其进行苏木精−伊红 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色及分析。取各组小鼠脾脏, 称重并计算脾指数, 并经70 μm细胞筛机械研磨后制备得到单细胞悬液, 裂解红细胞得到纯化后的小鼠脾脏细胞, 取1×10^{6}个细胞, 分别加入CD3-FITC、CD4-APC和CD8-PE抗体孵育30 min, 标记T细胞表面的CD3、CD4和CD8分子, 随后采用流式细胞仪检测。

统计学分析 本实验所有实验数据使用Graph Pad Prism 10.1.2软件进行统计学分析, 采用One-Way ANOVA单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$说明组间差异有统计学意义。

结果

1 PN-ELNs的表征

图1A展示了PN-ELNs的提取过程, 采取差速离心法分离得到PN-ELNs (平均蛋白质量浓度为2.1 ± 0.15 mg·mL^{-1})。NTA测出PN-ELNs的平均粒径为143.9 ± 2.1 nm (图1B), 通过TEM观察到PN-ELNs形态为单凹面近圆形 (图1C), 有明显的双层膜结构, 具有典型的类细胞外囊泡的特征。

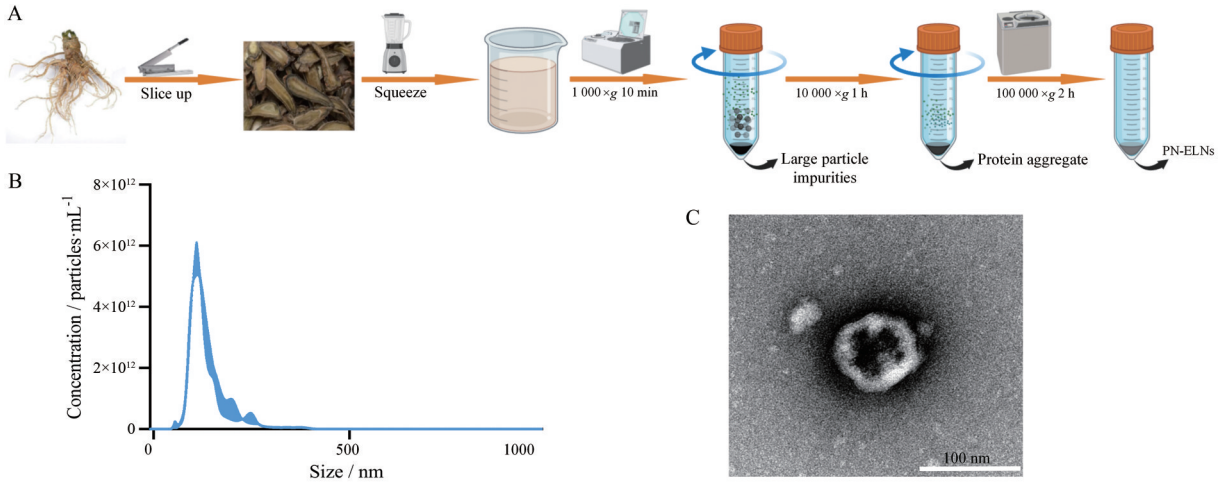


Figure 1 Extraction and characterization of *Panax notoginseng*-derived exosome-like nanovesicles (PN-ELNs). A: Differential centrifugation extraction; B: Particle size; C: Transmission electron microscope (TEM) morphology

2 多组学结果分析

2.1 脂质组学分析 对PN-ELNs的脂质组成进行分析, 结果如图2所示, 标识了三七囊泡所含脂质亚类(lipid class)的占比分布(图2A), 对丰富度排名前10的脂质亚类进一步进行统计分析(图2B): 其中主要由甘油三酯(triglyceride, TG, 46%)、甘油二酯(diglyceride, DG, 8%)、植物神经酰胺(plants ceramide, Cert)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、神经酰胺(ceramide, Cer)等组成, 以TG相对丰度最高, DG次之。其中TG与DG为脂代谢重要中间产物, 而神经酰胺类(Cert、Cer)在细胞的生长、增殖和凋亡的生物过程中具有重要的调节作用。上述脂质组成特征分析为探究PN-ELNs的生物学功能提供了脂质物质基础依据。

2.2 蛋白组学分析 对PN-ELNs中蛋白组成进行分析, 结果如图3所示, 共鉴定到1 355条长度分布符合质控的肽段, 可定量196种蛋白。对其中蛋白质进行GO功能注释(图3B), 可归属于三大功能类别: 参与生物过程(biological process, BP)的289种蛋白; 与细胞组分(cellular component, CC)相关蛋白94种, 分析功能(molecular function, MF)有关317种蛋白, 提示PN-ELNs所含蛋白可能在生物代谢过程、分子催化活性及细胞结构组成等方面发挥功能。KEGG通路富集分析显示(图3C), 涉及的82条通路中, 与代谢途径相关的通路占比最高。值得注意的是, 碳代谢、萜类骨架生物合成、葡萄糖醛酸代谢和双羧酸代谢等代谢途径的异常可能通过影响角质形成细胞增殖、免疫调节和炎症反应参与银屑病的发生发展, 为PN-ELNs在蛋白质层面与银屑病的关联展示了一定的潜力。

2.3 miRNA分析 对PN-ELNs中所含miRNA的种类及表达量进行分析, miRNA的序列总数如图4A所示, 共含miRNA序列6 056条, 将PN-ELNs中所含miRNA与其对应的靶基因进行富集分析, 由于在分子功能、细胞组分和生物过程3种功能上富集的序列数目比较多, 无法展示所有的富集分析结果, 因此分别将BP、CC、MF的序列按照注释到的靶基因数目由大到小排序, 分别挑选前25、15、10的序列进行绘图展示(图4B)。在图4C展示KEGG通路富集结果分析中, 相关性最高的氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)通路可通过能量合成、活性氧积累、免疫代谢失调等多途径调节银屑病。

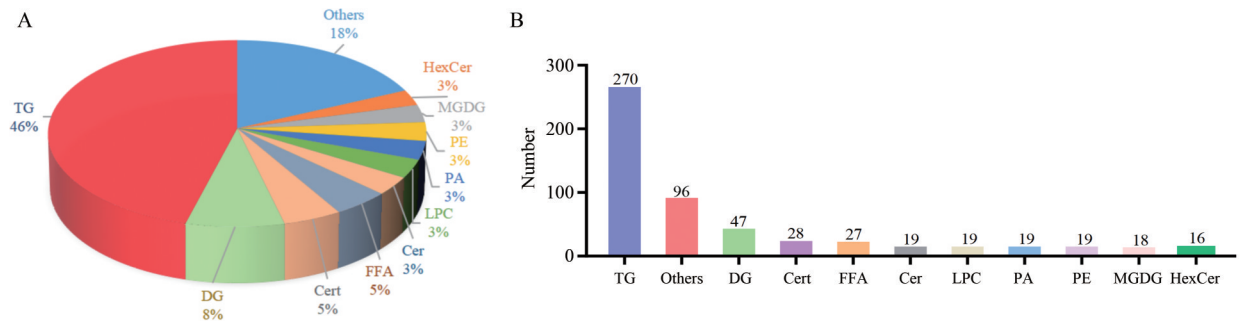


Figure 2 Lipidomics analysis in PN-ELNs. A: Lipid composition in PN-ELNs; B: Statistical diagram of Top 10 lipids

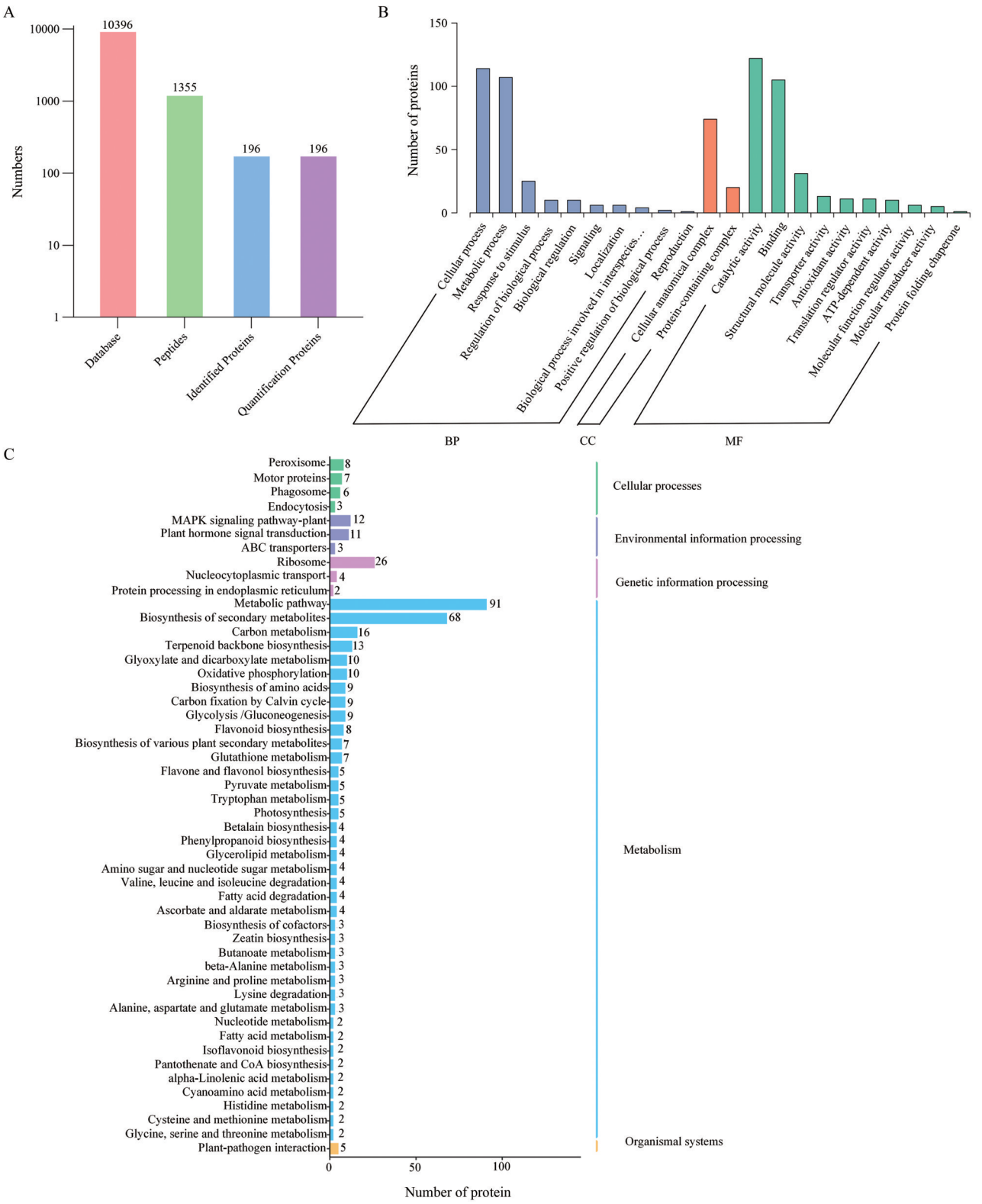


Figure 3 Proteomic analysis results of protein composition in PN-ELNs. A: Protein quantification; B: Protein GO enrichment; C: Protein KEGG pathway enrichment

3 PN-ELNs 在 HUVECs 细胞摄取及抑制成管作用

CCK-8 细胞检测结果如图 5A 所示, PN-ELNs 能抑制细胞增殖且呈浓度依赖性, 以囊泡蛋白质量浓度计, IC_{50} = 362.9 μg·mL^{-1}。细胞摄取结果表明 (图 5B), HUVECs 细胞与游离荧光探针 PKH67 和 PKH67-PN-ELNs 分别共孵育 2 h 后, PKH67-PN-ELNs 各组平均荧

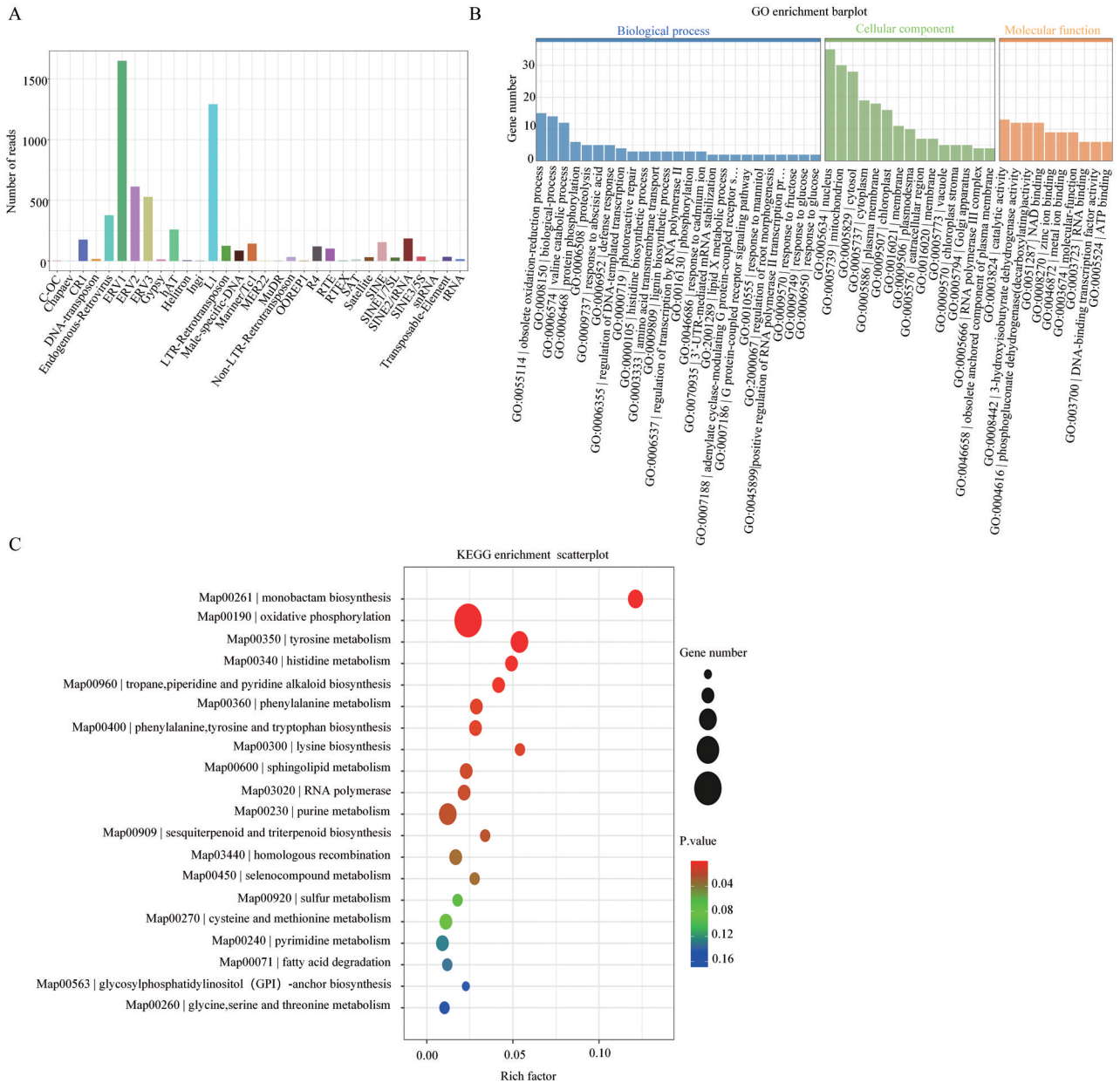


Figure 4 Analysis of miRNA composition in PN-ELNs. A: Total miRNA sequences; B: GO enrichment; C: KEGG pathway enrichment

光强度值均高于游离 PKH67 组, 且呈现浓度依赖特征。采用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察其细胞摄取行为 (图 5C), HUVECs 将 PKH67-PN-ELNs 内吞后, 主要分布在细胞核附近。

根据 IC_{50} 计算结果, 选取低于其 IC_{50} 值的 PN-ELNs 剂量, 蛋白浓度分别为 0、20、100 μg·mL^{-1} 3 个质量浓度, 评估 PN-ELNs 抑制 HUVECs 血管生成的能力。如图 5D 所示, 未加入囊泡组中, HUVECs 细胞能形成较成熟的管状结构, 而加入 20、100 μg·mL^{-1} 两个浓度的 PN-ELNs 后, 细胞均不能形成完整的管状结构。使用 Image J 量化各组的总分支长度, 图 5E 结果显示, 未加入 PN-ELNs 组的总分支长度均高于 PN-ELNs 各组。综上表明, PN-ELNs 不仅能显著抑制 HUVECs 的增殖活性, 容易被细胞摄取, 且有效抑制 HUVECs 的血管生成功能。

4 PN-ELNs 对 HaCaT 细胞增殖抑制及促凋亡作用

采用 CCK-8 法测定 PN-ELNs 对 HaCaT 细胞增殖的影响, 结果显示, 共培养 24 h 后, PN-ELNs 能显著抑制细胞增殖且存在剂量依赖 (图 6A)。通过拟合曲线计算得到 IC_{50} = 111.10 μg·mL^{-1} (图 6B)。采用不同蛋白浓度 (0、100、200、400 μg·mL^{-1}) 的 PN-ELNs 处理 HaCaT 细胞 4 h 后进行 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。结果表明 (图 6C), 无 PN-ELNs 组细胞的存活率高于 90%, 而 PN-ELNs 组细胞出现部分凋亡, 且随着 PN-

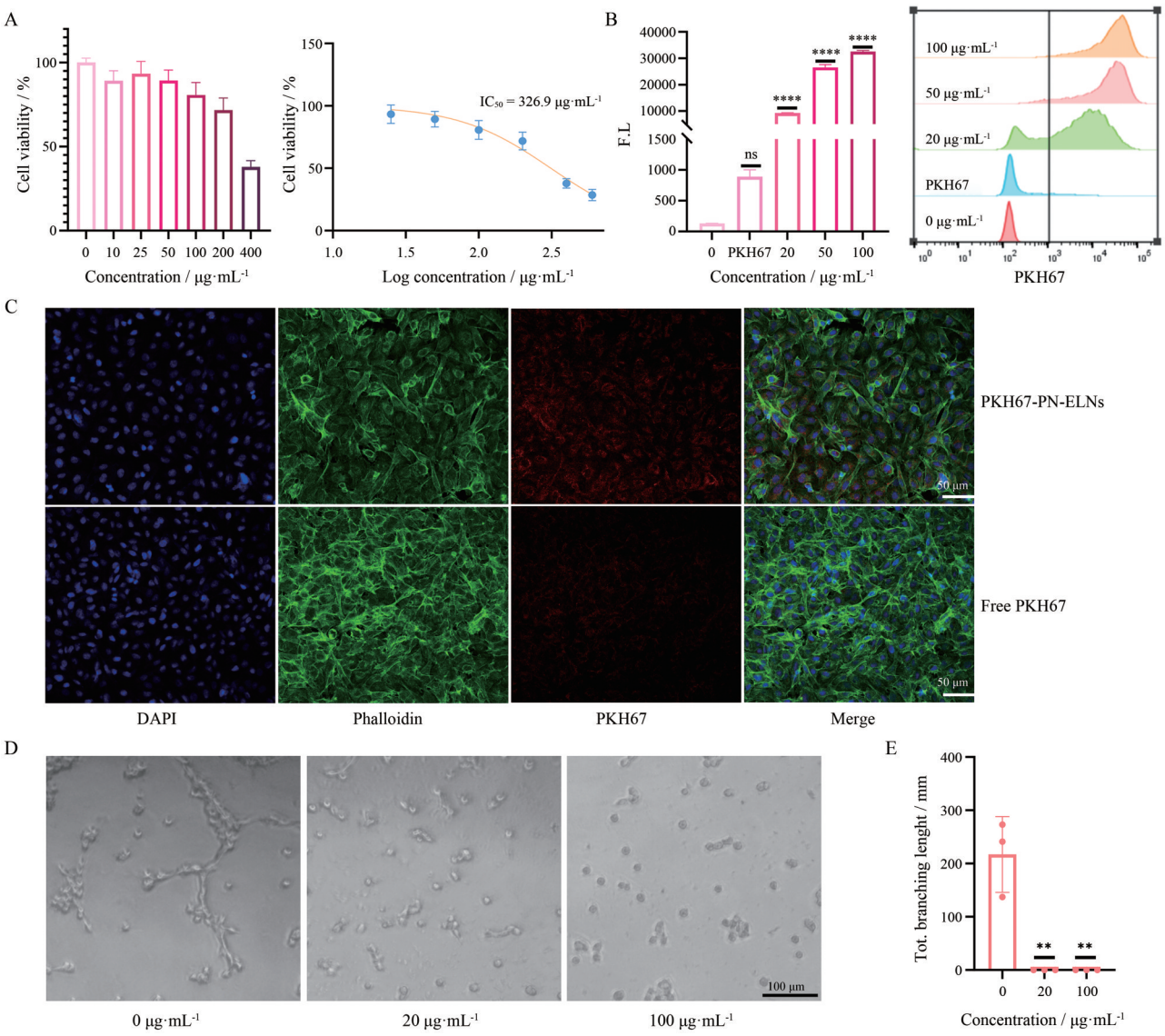


Figure 5　HUVECs uptake of PN-ELNs and inhibition of PN-ELNs on HUVECs angiogenesis. A: CCK-8 detection of HUVECs; B: Fluorescence statistics of HUVECs; C: Microscopic images of HUVECs scanning PN-ELNs (scale bar 50 μm); D: Microscopic imaging of cells in each group (scale bar 100 μm); E: Statistical chart of total vascular length. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control. ns: No signal difference

ELNs 蛋白浓度增加, HaCaT 细胞凋亡率呈现上升趋势, 同时各组间均有统计学差异。因此, PN-ELNs 在体外能有效抑制 HaCaT 细胞增殖, 并诱导 HaCaT 细胞凋亡。

5　PN-ELNs 对银屑病小鼠的治疗效果

5.1　体内实验症状评价　由图 7 可知, PN-ELNs 能改善 IMQ 诱导的小鼠银屑病的皮肤病理状态。图 7A 中可以明显观察到, control 组皮肤正常, 无红斑、鳞屑与皮肤增厚, model 组在实验期间皮肤病理状态呈逐渐严重的趋势, 泛红, 鳞屑与增厚明显, PN-ELNs-L 组和 PN-ELNs-H 组在给药后皮肤病理状态好转, 与 model 组相比, 无明显泛红, 鳞屑与增厚掉落。体重变化结果显示 (图 7B), 与 control 组相比, IMQ 会导致小鼠体重持续下降, 而 PN-ELNs 的使用在一定程度上减缓小鼠体重的减少。第 8 天小鼠体重平均值分别为 25.17 ± 0.56 g (control 组)、20.43 ± 1.12 g (model 组)、20.92 ± 1.34 g (PN-ELNs-L 组)、21.9 ± 0.9 g (PN-ELNs-H 组)。Model 组的 PASI 评分呈上升趋势, 而 PN-ELNs-L 组和 PN-ELNs-H 组在给药之后, PASI 评分明显下降, 且 PN-ELNs-H 组下降更快 (图 7C)。小鼠的皮肤 H&E 切片结果如图 7D、E 所示, control 组的平均厚度为 18.62 ± 4.02 μm, model 组的平均厚度为 104.85 ± 12.42 μm, 表明 IMQ 会诱导小鼠表皮层显著增厚; PN-ELNs-L 组的平均厚度为 51.65 ± 2.51 μm, PN-ELNs-H

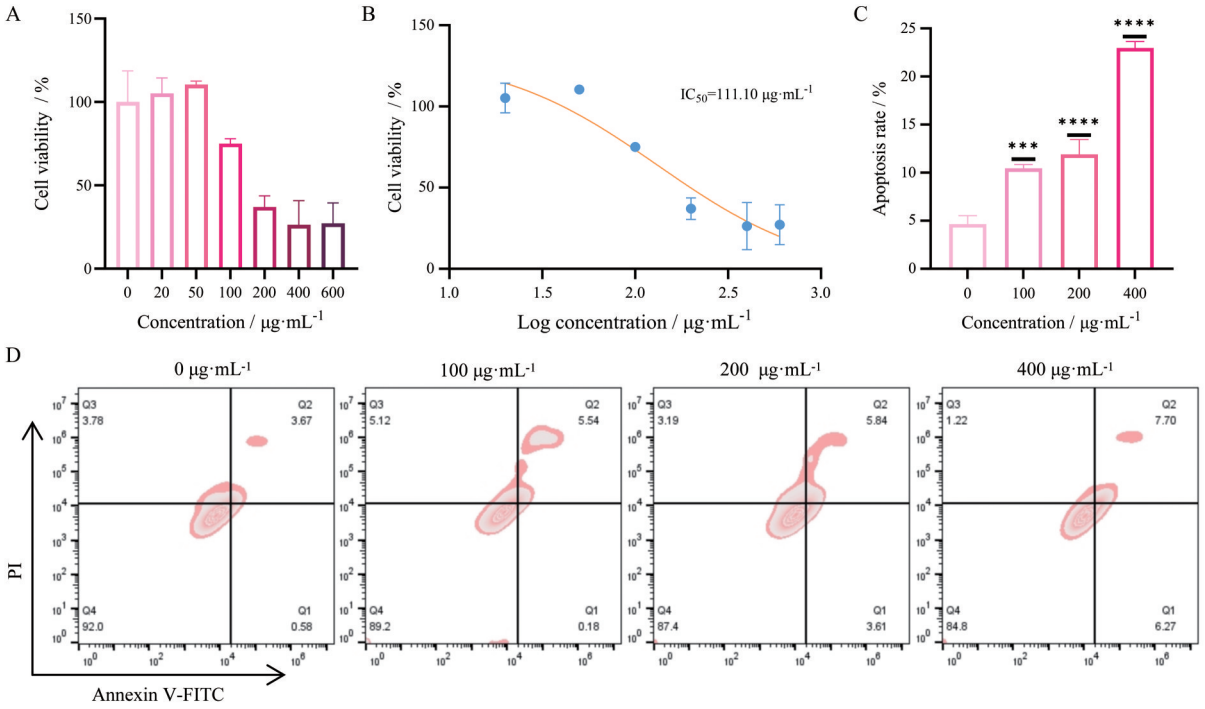


Figure 6 Promoting effect of PN-ELNs on HaCaT apoptosis. A, B: Histogram and IC_{50} fitting curve of HaCaT activity detection by CCK-8; C, D: Flow cytometry measurement of HaCaT cell apoptosis rate. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control

组的平均厚度为 46.01 ± 9.09 μm。综上所述, PN-ELNs 能在短时间内有效缓解 IMQ 诱导的小鼠银屑病的皮肤病理状态, 且不同浓度的 PN-ELNs 缓解效果不同。

5.2 免疫功能检测 脾指数通常作为机体免疫系统的指标, 用于评估免疫功能强弱。如图 8A、B 所示, control 组脾指数为 4.1 ± 0.5 mg·g^{-1}, model 组的脾指数为 18.01 ± 1.28 mg·g^{-1}, 且脾脏明显大于 control 组, 显示银屑病模型组小鼠免疫系统显著激活; PN-ELNs-L 组与 PN-ELNs-H 组的脾指数分别为 13.17 ± 1.29、11.61 ± 1.42 mg·g^{-1}, 且脾脏体积均小于 model 组, 免疫反应减轻, 说明 PN-ELNs 可减轻机体免疫反应, 对 IMQ 诱导的银屑病小鼠具有治疗效果。

源于脾脏中的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 是免疫系统中两类关键 T 淋巴细胞的表面标记蛋白, 分别参与协调免疫反应和直接杀伤感染细胞。$CD4^+/CD8^+$ 的值作为评价免疫调节功能的一项指标, 正常值约 1.4～2.0。免疫细胞检测结果显示, PN-ELNs 可以改善银屑病小鼠的免疫调节功能。如图 8D 所示, control 组的 $CD4^+/CD8^+$ 值为 1.45 ± 0.37, 在正常范围; model 组的 $CD4^+/CD8^+$ 值为 2.8 ± 0.29, 表明机体存在明显的自身免疫性疾病; PN-ELNs-L 组和 PN-ELNs-H 组的 $CD4^+/CD8^+$ 值分别为 2.21 ± 0.3 和 2.14 ± 0.19, 与 model 组存在差异, 趋于正常值。说明 PN-ELNs 对银屑病小鼠的免疫调节有明显的改善作用

讨论

PDEVs 具有独特药理活性、优异的生物相容性及制备工艺简单、成本低等特点, 在经皮给药治疗皮肤类疾病方面展示出巨大潜力[18-21]。例如: 有学者[18,19]研究发现人参囊泡能抑制 IL-1 的表达, 具有抗炎舒缓的功效, 同时还可直接刺激皮肤细胞的增殖和分化, 尤其是囊泡中的原人参二醇类皂苷[18,19]可以促进成纤维细胞的活性, 增强胶原蛋白的生成, 修复受损的皮肤组织; 何首乌囊泡[21]可减轻紫外线诱导的氧化应激, 抑制基质金属蛋白酶的产生, 减少细胞外基质降解, 促进胶原蛋白合成, 发挥抗光老化作用。本研究中 PN-ELNs 可通过血管新生并促进角质细胞凋亡, 短时间内在 IMQ 诱导的银屑病小鼠中促进其银屑样皮肤泛红减轻, 银屑掉落并抑制真皮层的组织增厚, 同时, 还可调节 IMQ 诱导的银屑病小鼠免疫功能恢复, 缓解银屑病症状。

三七加工过程是由新鲜三七转变成三七饮片的过程, 对三七质地和外泌体有着显著的影响, 鲜三七质地脆嫩含水量高, 显微镜下有着完整的薄壁细胞结构, 而三七饮片炮制热处理后, 质地坚硬含水量低, 细胞壁塌陷, 细胞结构被破坏; 在内在有效成分上, 因为炮制过程中的高温和烘干处理, 饮片中皂苷的含量会明显下

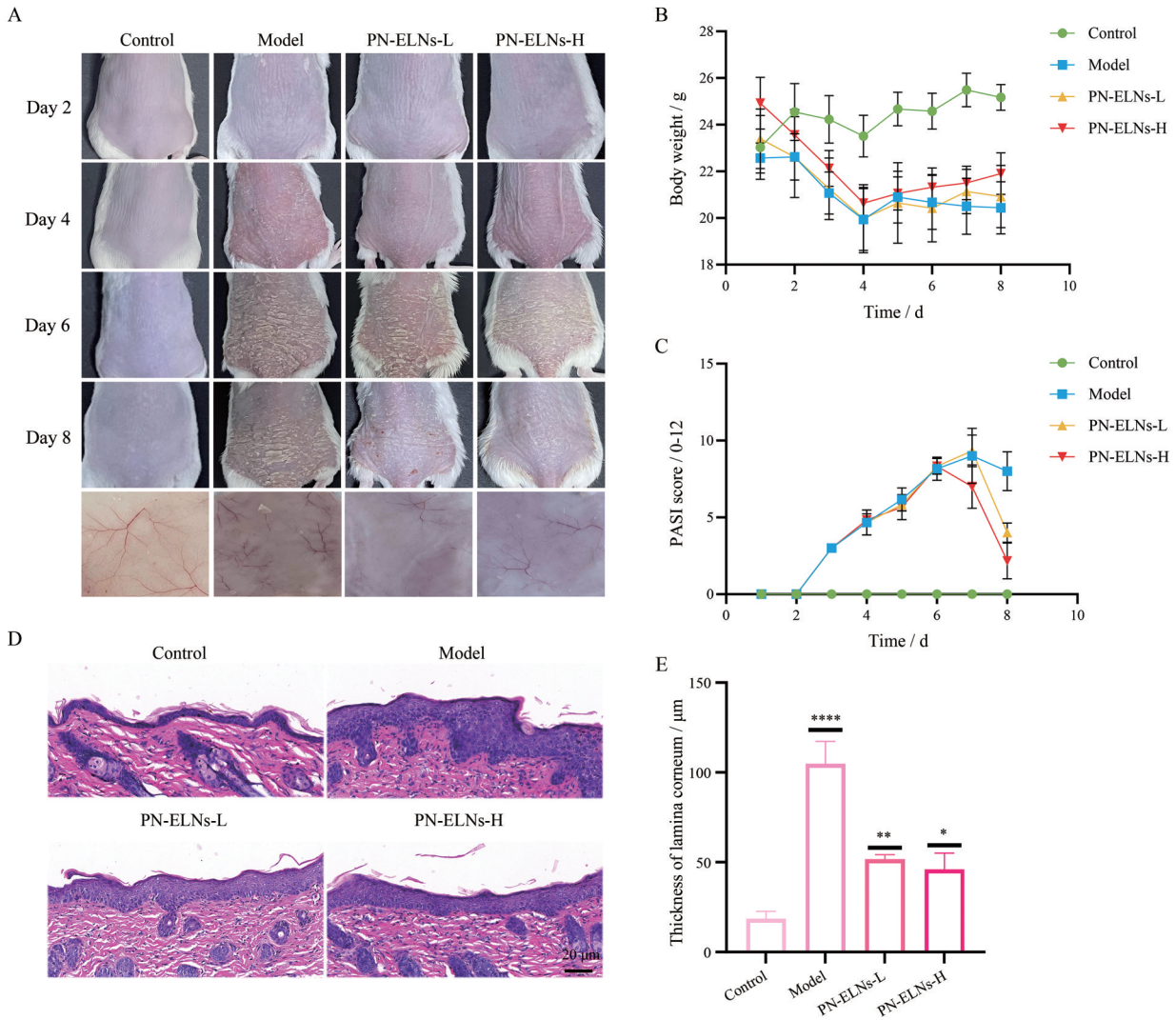


Figure 7 The regulatory effect of PN-ELNs on psoriasis skin in mice induced by imiquimod (IMQ). A: External skin of mice on days 2, 4, 6 and 8 and internal skin of mice on day 8; B: Mouse weight change chart; C: Mouse PASI score change chart; D: Mouse skin H&E stained sections. Scale bar = 20 μm; E: Statistical chart of thickening of the epidermis in mice. PN-ELNs-L: 50 mg·kg^{-1}; PN-ELNs-H: 100 mg·kg^{-1}. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control

降[22], 部分 miRNA 也会因为高温而失活[23]。故从鲜药中提取三七外泌体样纳米囊泡, 可较大程度上保留三七内含活性成分。本研究通过局部应用 PN-ELNs 于 IMQ 诱导的银屑病小鼠模型, 显著改善了皮肤病理状态, 同时, 银屑病作为一种自身免疫性皮肤病[20], PN-ELNs 可通过调节免疫细胞 $CD4^+/CD8^+$ 比值改善疾病状态下小鼠的免疫功能, 但是对 PN-ELNs 的给药方式并未进行系统考察。目前, PDEVs 的应用研究已涵盖口服、外用等多种给药途径[24,25], 本研究可为 PN-ELNs 用于银屑病治疗的剂型开发提供药理学依据和研究基础。

本研究系统探究了鲜三七来源外泌体样纳米囊泡 PN-ELNs 的组成特征及其对 IMQ 诱导银屑病的治疗作用。结果表明, PN-ELNs 富含多种活性成分, 局部应用可显著改善小鼠银屑病样皮损并调节免疫功能。然而, 研究存在以下局限, 如 PN-ELNs 制备工艺未系统优化, 影响规模化生产可行性; 虽观察到在 IMQ 小鼠中的显著疗效 (PASI 评分降低), 但未通过组学技术阐明其作用靶点; 已鉴定的 196 种蛋白和 6 056 条 miRNA 与银屑病通路相关, 但其具体调控机制仍需验证。本研究为 PN-ELNs 治疗银屑病提供了实验依据, 其深入机制有待进一步探索。

作者贡献: 陈翔宇、粟丽君、冉克梅负责实验设计、实验开展及论文撰写; 全蕾、崔艺曦负责协助进行实验数据采集与分析; 张晨、章津铭、刘洋、王迪负责论文指导及修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

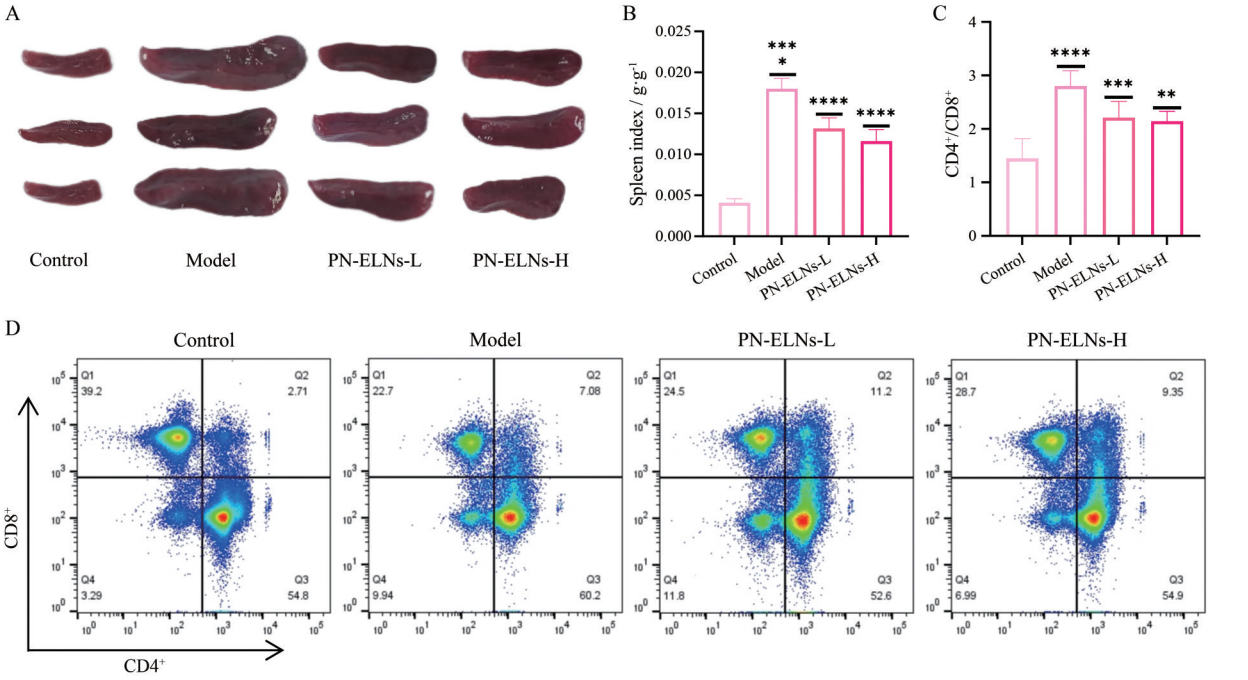


Figure 8 Immune cell detection and spleen index. A: Mouse spleen. Scale bar = 1 cm; B: Statistical histogram of mouse spleen index; C, D: Flow cytometry measurement of $CD4^+$ and $CD8^+$ ratio. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control

References

[1] Ghoreschi K, Balato A, Enerbäck C, et al. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis [J]. Lancet, 2021, 397: 754-766.

[2] Venereology Branch Psoriasis Professional Committee Chinese Medical Association Dermatology. China psoriasis diagnosis and treatment guidelines (2023 Edition) [J]. Chin J Dermatol (中华皮肤科杂志), 2023, 56: 573-625.

[3] Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, et al. Psoriasis [J]. Lancet, 2021, 397: 1301-1315.

[4] Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. JAMA, 2020, 323: 1945-1960.

[5] He LY. On the treatment of psoriasis from "blood" [J]. Chin J Clinicians (中国临床医生杂志), 2025, 53: 116-119.

[6] Li WT, Jiao JF, Zhou HH. Clinical observation of Tongluo Sanyu Decoction combined with Maohuo needle for the treatment of blood stasis type psoriasis [J]. J Pract Tradit Chin Med (实用中医药杂志), 2025, 41: 484-487.

[7] Wu JJ, Tian XH. Clinical efficacy of Tongbian Gua Sha on plaque psoriasis (blood stasis syndrome) [J]. J Med Theory Pract (医学理论与实践), 2023, 36: 2418-2420.

[8] Ran CJ. Clinical Efficacy Observation of Taohong Siwu Decoction Combined with TCM External Treatment for Blood Stasis Syndrome in Plaque Psoriasis (桃红四物汤联合中医外治法对寻常型银屑病血瘀证的临床疗效观察) [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2024.

[9] Liu JL, Qian JL, He JY, et al. Clinical efficacy observation of Miao Hu Zhen combined with Huoxue Sanyu Tang in treating patients with blood stasis syndrome of psoriasis [J]. Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med (中国中西医结合皮肤性病学杂志), 2023, 22: 531-534.

[10] Wei GX. Observation on the treatment of 100 cases of common psoriasis with Gan Zi Sanqi Powder [J]. J Pract Tradit Chin Med (实用中医药杂志), 2010, 26: 755.

[11] Yang BN, Lin YY, Huang YC, et al. New uses of *Panax notoginseng* and panax notoginseng extract in the preparation of drugs for treating psoriasis: CN, 105796620 [P]. 2016-07-27.

[12] Hao SY, Yang HY, Hu JJ, et al. Bioactive compounds and biological functions of medicinal plant-derived extracellular vesicles [J]. Pharmacol Res, 2024, 200: 107062.

[13] Feng J, Xiu Q, Huang Y, et al. Plant-derived vesicle-like nanoparticles as promising biotherapeutic tools: present and future [J]. Adv Mater, 2023, 35: e2207826.

[14] Wang WQ, Yang YT, Su ZH, et al. Advances in the study of extracellular vesicles from plants in wound repair [J]. Chin J Burns (中华烧伤与创面修复杂志), 2024, 40: 1199-1204.

[15] Lin FY, Wang T, Ai JW, et al. Topical application of Tea leaf-derived nanovesicles reduce melanogenesis by modulating the miR-828b/MYB4 axis: better permeability and therapeutic efficacy than conventional tea extracts [J]. Mater Today Bio, 2025, 34: 102108.

[16] Liu YC, Gao QZ, Zhao YX, et al. On the treatment of deep II-degree skin burns in rats with bitter melon exosomes combined with mupirocin ointment [J]. J Xuzhou Med Univ (徐州医科大

学学报), 2023, 43: 584-589.

[17] Huang R, Jia B, Su D, et al. Plant exosomes fused with engineered mesenchymal stem cell-derived nanovesicles for synergistic therapy of autoimmune skin disorders [J]. J Extracell Vesicles, 2023, 12: e12361.

[18] Yang S, Lu S, Ren L, et al. Ginseng-derived nanoparticles induce skin cell proliferation and promote wound healing [J]. Ginseng Res (人参研究), 2023, 47: 133-143.

[19] Choi W, Cho JH, Park SH, et al. Ginseng root-derived exosome-like nanoparticles protect skin from UV irradiation and oxidative stress by suppressing activator protein-1 signaling and limiting the generation of reactive oxygen species [J]. Ginseng Res (人参研究), 2024, 48: 211-219.

[20] Liu JW, Zhu L. New advances in the pathogenesis and drug research of psoriasis [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 2942-2951.

[21] He JJ, Fu LQ, Shen YY, et al. *Polygonum multiflorum* extracellular vesicle-like nanovesicle for skin photoaging therapy [J]. Biomater Res, 2024, 28: 0098.

[22] Xu CP, Fang QL, Cui H, et al. Comparison of the components of fresh *Panax notoginseng* processed by different methods and their anti-anemia effects on cyclophosphamide-treated mice [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118148.

[23] Kim K, Park J, Sohn Y, et al. Stability of plant leaf-derived extracellular vesicles according to preservative and storage temperature [J]. Pharmaceutics, 2022, 14: 457.

[24] Liu YL, Tao SM, Zhang ZW, et al. *Perilla frutescens* leaf-derived extracellular vesicle-like particles carry Pab-miR-396a-5p to alleviate psoriasis by modulating IL-17 signaling [J]. Research (Wash D C), 2025, 8: 0675.

[25] Su DD, Li MC, Xie YD, et al. Gut commensal bacteria *Parabacteroides goldsteinii*-derived outer membrane vesicles suppress skin inflammation in psoriasis [J]. J Control Release, 2025, 377: 127-145.